

新疆人兽共染病文集

(第一辑)

史丕裕

陈国仕

主编



● 新疆人民出版社

新疆人兽共染病文集

(第一辑)

史丕裕 陈国仕 主编

新疆人民出版社

新疆人兽共染病文集

(第一辑)

史丕裕 陈国仕 主编

新疆人民出版社出版发行

(乌鲁木齐市建中路54号)

新疆新华印刷二厂印刷

787×1092毫米 16开本 19.75印张 3插页 460千字

1989年8月第1版 1991年3月第1次印刷

印数: 1—2,160

ISBN7—228—00653—4/S·47 定价: 5.55元

主 编 史丕裕 陈国仕

副主编 金根源 孔昭敏 黄 建 崔君兆 陆东林

编 委 （按姓氏笔划为序）

孔昭敏	石 磊	史丕裕	刘连珠	叶瑞玉	成良德	朱文杰	向超群	李晓玲
李东阳	李增齐	陈国仕	陈菊梅	谷登峰	陆东林	芦荆瑜	杨鸿超	金根源
郑光宇	俞树荣	郭宝震	崔君兆	黄 建	黄尚志	雷化云	钟苡芳	

审 阅 李 浩 陈绍先

COLLECTED WORKS OF ZOO NOSES JN XINJIANG, CHINA.

(First volume)

Chief in Edition
Shi Peiyu Chen Guoshi

XINJIANG PEOPLE'S PUBLISHING HOUSE

Urumqi, China.

人兽共染病种类很多,严重危害人兽健康造成巨大经济损失但尚未予以足够重视。《人兽共染病》一书记载了二十余种人兽共染病的调查研究资料,诊断测试新技术,免疫防治新方法,对有关工作者是很有用的参考书。愿希有关领导重视此类病。

程绍迴

一九八九.四.十.

序

人兽共染疫病,大多是虫媒感染所致的动物源性疾病,在自然界动物中间保有某些病原体,即在自然界分布有贮存宿主动物。病原体主要是通过节肢动物媒介,在脊椎动物以及它们与人类之间自然地传播。所以,这类疾病通常都是自然疫源,表现于生物学上,则是异质和异种的关系;在地理上大多是地方性的,但也有异域性的,即所谓外源性感染,例如近年在欧洲发生的拉沙热(Lassa fever),来源于非洲,病死率可达30—50%。

1982年世界卫生组织(WHO)与联合国粮农组织(FAO)专家委员会联合讨论会所列举的细菌性(含立克次体)和病毒性动物源性疾病共有78种。苏联科学院已故巴甫洛夫斯基院士27年间(1938—1965)完成了200多次流行病——寄生虫病学综合科学调查,证实了自然疫源性疾病有300余种。据联合国粮农组织估计,全世界每年因动物源性疾病而减产乳类产量3000万吨以上,可供2亿儿童每天饮用两杯。所有这些,都说明动物源性疾病的严重危害性。

鉴于同一病源体可能在自然界存在多种媒介和贮存宿主,传播感染的途径就复杂化了。从医学生态学的角度看,这确是一个莫大的课题,同时也给防制带来了新问题,势必得考虑生态学的防制与监测;再从临床工作看,也扩大了医生的诊治视野,使之注意到超出临床范畴的疾病生态方面的问题。

新疆位于亚洲腹地,面积占全国1/6,气候与地理条件复杂,自然景观多样,野生动物资源颇为丰富。这里是开发大西北的战略基地,也是发展畜牧业的重要地区。然而,本区却分布有多种人兽共染的自然疫源性疾病,已知重要者如森林脑炎、蜱媒出血热、蜱媒斑点热、狂犬病、Q热、鼠疫、布鲁氏菌病、野兔热、炭疽、巴贝虫病、泰勒氏焦虫病、黑热病等等。所以说,我们在新疆搞好了人畜共染自然疫源性地方病的防治和监测工作,就是抓住了“除害灭病”问题的重要方面。

中央领导非常关心地方病的防治工作,先后多次作过重要指示。这项工作直接关系着人民的健康,关系到社会主义千秋大业。

史丕裕、陈国仕等同志在新疆维吾尔自治区科协和地方病防治办公室帮助下,把积累多年的调研资料,编辑成《新疆人兽共染病文集》,目的在于增进交流、互通科技信息,并对广大基层人员提供参考;希望对专业人员业务工作与学习能有所帮助。为编文集,许多同志都作了不懈的努力。我跟大家一样,期待它早日问世,并盼望今后陆续出版。

新疆维吾尔自治区科协副主席 章道彬

前 言

人兽共染疫病包括不少危害人、畜健康的地方病，对其研究和扑灭工作，党和人民政府历来都是非常关心的。我们新疆地域辽阔，边境线长，外与蒙古、苏联、印度、巴基斯坦、阿富汗等国接壤，战略地位十分重要；内与青海、甘肃、西藏毗邻，地理生态都很复杂。在生物进化过程中，野生动物及家畜通过食物链锁，与某些病源微生物和寄生物以及吸血节肢动物，在特定的自然环境中形成了相互依赖的生物群落，并且成为某些人类疾病的传染源，对人类的健康构成极大威胁。仅以新疆人畜共患疫病——布鲁氏菌病和结核病为例，布病患者达25万之多，占全国总数的一半，至今尚未完全得到治疗；结核病死亡率也居全国之首，比调查152个国家地区14亿人所得患病率0.075%，高20多倍，目前尚有20多万现症结核病人，每年可能还有2—3万新发病人。因结核病引起死亡以及因上述两种病而丧失劳动力的人数更是惊人。其它自然疫源性疾病对人的健康和对牧业的发展也影响极大。开拓和建设祖国边陲的勤劳勇敢的各族人民，长年累月受到上述疫病的威胁，我们必须研究制定有效的防治措施。

解放后，新疆各级医疗和科研部门逐渐开展了人兽共染疫源的调查和防治。30多年来做了大量工作，并取得了丰硕成果。其中有的已用于生产实践，有的则分散发表在各种学术刊物和内部刊物上。党的十一届三中全会以来，新疆广大科技工作者精神振奋，斗志昂扬，以尽快地开发大西北为己任，努力攀登科技高峰，并取得了可喜的成绩。

中国人民解放军医学科学院微生物流行病学研究所蜚类专家陈国仕教授和我区高级兽医师史丕裕，早在青年时代就投身于防病灭病的工作，治学严谨，锲而不舍，特别是在自然疫源性疾病的研究方面具有丰富的实际经验和较深的理论修养，他们组织有关科技人员收集了大量文献，编辑成《新疆人兽共染病文集》（第一辑），对于总结科研成果，促进学术交流，防止人、畜疫病，无疑具有重要意义。

年逾古稀的老一辈科学家程绍迥和章道彬教授特为《文集》题词和作序，使我深受感动。我由衷地赞赏学术界老前辈提出的高见和希望，支持陆续出版以后各辑，以满足医学、兽医学工作者以及基层广大实际工作者的需要。

新疆维吾尔自治区畜牧厅副厅长 李涵春

目 录

抗布氏杆菌544A蛋白抗原单克隆细胞株的建立及实验研究	(1)
牛种布鲁氏菌亚单位苗的试验研究	(6)
布病牛用BG ₁₂ ——McAb治疗前后血清中无机元素含量的变化	(10)
新疆布氏杆菌病流行情况	(17)
新疆布氏杆菌病调查报告	(19)
M ₅ 粉雾首次用于豚鼠免疫的保护试验	(22)
M ₅ 菌苗粉雾免疫牛不完全抗体测定	(27)
布鲁氏菌病19号菌苗野外气雾免疫试验与研究	(30)
青少年人群布鲁氏菌活菌苗气雾免疫实验观察	(34)
布氏菌羊型5号和猪型Ⅱ号苗对羊群粉雾免疫的观察	(38)
布氏M ₅ 菌苗对牛粉雾免疫效果的观察报告	(46)
布氏羊型五号菌苗对绵羊粉雾免疫的效果观察报告(一)	(51)
布氏羊型五号菌苗对绵羊粉雾免疫的效果观察报告(二)	(61)
布鲁氏菌(弱毒)固相气溶胶对家畜遥控爆炸免疫的研究	(67)
布氏、炭疽弱毒苗及羊厌气梭苗干粉苗采用二联或多联对绵羊的免疫效果观察	(73)
布氏羊型五号菌苗对羔羊免疫持续期的实验研究	(79)
新疆地区首次从犬体内分离到牛种Ⅲ型布氏菌	(83)
乌鲁木齐地区人布鲁氏菌病感染情况调查报告	(86)
哈密市控制布病后疫情动态分析	(91)
布鲁氏菌素皮内变态反应与血清学反应关系研究	(94)
试制布鲁氏菌间接血凝胶体抗原对人畜血清检验的研究	(97)
新疆85株羊I型布鲁氏菌的检出及其原因分析	(102)
布鲁氏菌与土拉弗氏菌病在新疆人畜中的流行病学调查与病原分离	(110)
新疆塔城、阿勒泰地区土拉弗氏菌病血清学与病原学调查	(115)
新疆塔城地区土拉弗氏菌病自然疫源地的调查	(120)
新疆温泉县土拉菌病调查报告	(122)
新疆炭疽病的发生与流行	(126)
水貂炭疽病防治工作报告	(130)
SPA协同凝集抑制试验检查Q热抗体	(132)
精河县Q热立克次体的分离与鉴定	(134)

病原分离的新途径——非洲钝缘蜱离体吸血分离Q热立克次体..... (136)

新疆北部地区斑点热群立克次体的鉴定..... (141)

乌鲁木齐地区猪、鸡、鹅小肠结肠炎耶尔森氏菌带菌调查..... (146)

新疆塔城地区野兔热血清学调查报告..... (151)

马传染性脑脊髓(膜)炎的发生与防治..... (155)

新疆人畜军团病血清学调查和后肢瘫痪羔羊嗜肺军团菌分离及鉴定..... (158)

嗜肺军团病感染方式的实验研究..... (163)

新疆博尔塔拉蒙古自治州嗜肺军团菌病自然感染调查报告..... (167)

嗜肺军团菌I型对健康羔羊免疫前后抗体滴度的比较..... (170)

中国人畜弓形体病调查研究进展..... (172)

新疆地区人、牛、羊、马弓形体感染调查..... (178)

新疆博尔塔拉地区弓形体病流行病学特点..... (180)

水貂犬瘟热病的诊断报告..... (184)

狗犬瘟热病在阿克苏地区的流行概况..... (186)

新疆地区弓形体感染情况调查..... (188)

中国狂犬病的防治历史和现状..... (192)

新疆鼠疫菌的研究..... (205)

新疆人体蠕形螨的感染情况调查..... (213)

新疆蜱类及医螨研究概况..... (217)

新疆地区双翅目吸血昆虫对人畜的侵袭及虻类名录简述..... (225)

马的李氏杆菌、奴卡氏菌、念珠菌和着色真菌混合感染的诊断报告..... (229)

新疆包虫病的流行概况(摘录)..... (235)

新疆塔城地区绵羊包虫病的感染强度与67例患者诊治分析..... (239)

纯化抗原和粗抗原在包虫病点免疫结合法诊断试验中作用的评价..... (244)

干血清滤纸点免疫结合法诊断棘球蚴病..... (249)

羊棘球蚴液抗原点免疫结合试验诊断包虫病的研究..... (252)

抗一包虫囊液抗原单克隆抗体细胞系的建立及临床应用研究..... (257)

和布克赛尔县人群包虫病感染情况调查报告..... (259)

中国虫媒病毒估计..... (261)

新疆天山林区森林脑炎病毒分离与鉴定..... (269)

抗一森林脑炎病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及实验研究..... (276)

森林脑炎病毒感染小白鼠S₁₈₀腹水瘤的观察..... (281)

玛纳斯天山林区野生啮齿类动物及其与蜱类的宿主寄生关系调查..... (289)

夏季放牧中马群蜱类寄生状况的调查报告..... (292)

超低容量喷洒辛硫磷、杀螟松对全沟硬蜱杀灭效果的初步观察..... (294)

鸡蜱及其防治..... (297)

阿尔金山自然保护区布鲁氏菌病等抗体的初步调查..... (304)

新疆北部地区野生动物自然疫源性疫病初步调查..... (308)

编后话..... (310)

抗布氏杆菌544A蛋白抗原单克隆 细胞株的建立及实验研究

史丕裕 石磊 王莉 金根源

利用细胞杂交方法制备特异性抗体,近年来在医学生物学方面得到广泛的研究。国外已有Holman等人用照射处理的 S_{2308} 作为免疫原获得稳定分泌抗 S_{19} 、 S_{2308} 和 S_{113} 菌株的特异抗体。Gretherdt等人用牛布氏菌1113菌株完整菌体免疫Spragatdauley系大白鼠,分离B淋巴细胞,以聚乙二醇使之与Sp 2/0瘤细胞融合,获得一种分泌抗牛种和羊种脂多糖相关抗原决定簇抗体的杂交瘤细胞系。

我们用544A菌株经超声粉碎制备的蛋白抗原建立了一株能稳定分泌抗544A的IgG的单克隆抗体细胞株,所产生的单抗与土拉弗氏菌、结肠耶尔森氏菌等无交叉反应,并且与布氏杆菌羊型 B_{115} 、猪型 S_{1330} 亦未见交叉反应(ELISA),证明了它高度的特异性。目前经半年之久反复传代及冻融,效价稳定,上清液效价为1:100,腹水中高达1:10⁵以上,并进行了体内外抑菌试验。进一步的临床实验与菌型鉴别尚在深入实验中。

材料与方 法

(1)小鼠骨髓细胞SP 2/0株:由日本庆应大学生物系安田健次郎教授赠送。

(2)BALB/C小鼠:由中国医学科学院购入,本室单独饲养。

(3)布氏杆菌544A蛋白抗原:牛型544A菌株经超声粉碎(9000赫兹、25分钟),再经10000rpm离心30分钟收集上清, Sephadex G200层析收集,蛋白含量1.4毫克/毫升,供免疫和检测使用。此抗原保护力测定达86.8%。

(4)免疫:含量为1.4毫克/毫升蛋白的抗原加等量福氏完全佐剂,选取6周龄BALB/C小鼠腹腔免疫,0.2毫升/只,间隔15天作第二次免疫,经一个月之后于尾静脉注射0.1毫升抗原,72小时后供细胞融合用。

(5)细胞融合:先用不含血清之RPMI1640液冲洗下对数生长期旺盛的SP 2/O瘤细胞,并经低速离心洗涤3次,计数。随即拉颈活杀免疫小鼠,由上膊动脉收集全血后无菌取出脾脏,置无菌平皿内加入少许冷洗液除尽胰脏及脂肪后,置于顶部加有80目尼龙网一张的50毫升离心管上,加少许冷洗液,用一注射器活塞压磨,并冲洗脾细胞到管内,加入约20毫升洗液(4℃)经低速离心洗涤两次并计数。按1:5比例将二者混合再离心,可见到管底明显分为二层,底层为白色瘤细胞,上层为红色脾细胞。倒尽上清使混合细胞泥状物充分混合。于37℃1分钟内滴加50%浓度PEG(分子量2000),边加边摇使之均匀,滴加洗液约15毫升,加完后静置2分钟,并用吸管轻轻吸取沉淀细胞吹撒于上清液中,离心5分钟,去掉上清,加入含20%

新生牛血清的RPMI1640营养液(含H·T液),轻轻混合成细胞悬液,分种96孔细胞培养板(Linbro, USA),于第二天加入含双倍A的HAT选择液,置37℃、含5.5%CO₂孵箱内,静置培养5天,换液,第10天换H·T液。

(6)取BG₁₂杂交瘤细胞系扩大培养后,注入预先经流动石蜡处理(每只注射灭菌石蜡油0.5毫升)二周后的BALB/C小鼠,每只注入 1×10^6 细胞,一周左右可收获腹水。离心后沉淀之细胞可供接种,勿需培养。

(7)ELISA法用BG₁₂对布鲁氏杆菌、土拉弗氏菌、结肠炎耶尔森氏菌进行测定,证明无交叉反应。

(8)ELISA法用BG₁₂对不同型布鲁氏杆菌进行了检测,如羊型16M、REV—I、B₁₁₅、青海株猪S—2和牛型544A、S_{85A}(五一农场野毒株)和三坪农场野毒株布菌牛种菌。

(9)BG₁₂单抗于体外的抑菌试验:用BG₁₂单抗作 10^3 — 10^5 倍稀释与S_{85A}(10^5 /毫升菌数)37℃孵育后平板培养计数,取生长菌落。同时用四环素 1 — 10^5 单位/毫升和本室用BG₁₂偶联四环素三组进行了试验,对照组为生理盐水加五一农场野毒株布菌牛种菌。

(10)于小白鼠(18—20克)腹腔注入544A或S_{85A} 6×10^5 /只,同时肌注氢化可的松2毫升/只作为治疗模型,经72小时后注射不同稀释浓度的BG₁₂单抗,一周后活杀测菌数。

结 果

(1)于融合后第五天第一次换液时,镜检有小的亮细胞团,在加入巨噬细胞换液后第八天,可见克隆已生长占孔底约1/5。以ELISA检测,凡比值高于阴性对照(营养液)2倍以上判为阳性。

结果:融合率为53%(97/182),阳性率为9%(7/97)阳性孔号为1D₁、1E₃、2B₁₂、2E₈、2F₂、2F₆和2H₃。

对2E₈进行克隆化后选出G₁₂,经连续克隆化扩大培养,接种小鼠供进一步实验,其它细胞冻存。

(2)BG₁₂杂交瘤细胞系培养上清和接种BALB/C小鼠腹水抗体效价分别为1:100和1:10⁵以上。腹水抗体效价高于培养上清效价1000倍。

(3)BG₁₂单抗与土拉弗氏菌、肠炎耶尔森菌以及牛、羊、猪型布氏杆菌的交叉试验。表1结果说明抗布氏杆菌544A BG₁₂单抗仅544A、SA(五一农场新近分离)和标准抗原(布氏杆菌试管抗原)呈现阳性反应(表1)。

(4)BG₁₂细胞系无血清培养上清浓缩30倍,经上海生物制品研究所供给的抗Balb/c鼠IgG亚型和IgM标准血清以琼脂糖双相扩散鉴定为IgG型。

(5)BG₁₂细胞系由本科遗传室按染色体常规制片,镜检染色体数为112—90条。

(6)体内抑菌试验结果:BG₁₂细胞系单抗作不同浓度稀释并以不同浓度四环素和盐水作对照,结果当单抗稀释至 10^{-5} 时S_{85A}抑菌率达95.35%,四环素含1个单位/毫升为93%,而对照则为0(以100%出菌计算),详见表2。

(7)取成年小白鼠每只接种544A强毒 6×10^5 个,同时肌注氢化可的松2毫克/只。于72小时后分别注入 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 等不同稀释浓度的单抗,各组每周活杀一只,由脾脏分离培养并作菌落计数,详见表3。共观察5周,平均值544A 10^{-3} — 10^{-5} ,总抑菌率占

85.3%， $S_{85A}10^{-3}$ — 10^{-5} ，总抑菌率占84.6%，两组无显著差异（ $P>0.05$ ）。

表1 BG₁₂单抗与土拉费氏菌、耶尔森氏菌、牛、羊、猪种布氏杆菌交叉（ELISA）试验

抗 原 名 称	ELISA试验N/p值	结果判定
土拉费氏菌	1.7	—
结肠炎耶尔森氏菌	1.4	—
标准抗原	2.7	+
16M（羊）	1.3	—
S—2（猪）	1.4	—
544A	3.9	+
S _{85A}	2.1	+
青海型（羊种菌）	1.6	—

表2 倾 碟 培 养 结 果

结 果		1	2	3	4	5	6	7
组 别								
MCAb	成分A	1×	10×	100×	1 000×	10 000×	50 000×	100 000×
	出 菌	9	11	14	7	3	2	1
	抑菌率	80.23	84.89	84.6	89.6	94.19	98.03	95.35
B—MCAb	成分A/B	1/100 000	10/50 000	100/10 000	1 000/1 000	10 000/100	50 000/10	100 000/1
	出 菌	—	—	—	—	—	3	7
	抑菌率	100	100	100	100	100	94.19	90.8
盐 酸 四环素	成分B	100 000	50 000	10 000	1 000	100	10	1
	出 菌	—	—	—	—	—	—	3
	抑菌率	100	100	100	100	100	98.84	93.03
盐水对照	成 分	—	—	—	—	—	—	—
	出 菌	0	0	0	0	#	#	#
	抑菌率	—	—	—	—	0	0	0

*A：MCA b。B：四环素。出菌数：为每组50个平皿的平均值，菌落过多不易计数者以#表示。

表 3

不同布氏强毒菌感染小白鼠经不同稀释度MCAb治疗后的对比试验

组 别	周 次	平 均												
		日期												
		脾含菌(亿)												
		MCAb												
544A	10 ⁻³	I		II		III		IV		V		菌 数	抑菌率	
	24/4	1/5	8/5	15/5	22/5									
	菌 数	抑菌率	菌 数	抑菌率	菌 数	抑菌率	菌 数	抑菌率						
	314 666	97.7	21000000	2.8	1 125 125	62.0	402 895	92.7	1 500	99.9	4 568 833			68.17
	323 666	47.6	470 000	97.8	157 125	94.7	126 625	97.7	40 200	97.7	223 523			98.2
S _{85.4}	10 ⁻⁵	768 333	94.3	152 257	92.45	775 375	73.8	1 025 500	81.35	3 500	99.8	680 750	94.5	
	平均	238 389	98.2	7 664 190	64.5	318 333	89.25	15 067	99.73	15 067	99.4	1 823 074	85.30	
	10 ⁻³	877 250	92.98	3 506 333	83.76	1 370 125	55.73	7 316 125	33.02	3 500	99.8	2 615 057	78.92	
	10 ⁻⁴	696 666	93.4	2 800 000	87.04	4 232 286	42.9	718 000	86.9	500	99.9	1 729 491	86.06	
	10 ⁻⁵	4 850 000	64.1	110 000	99.5	320 571	89.2	1 499 375	72.74	8 250	99.5	1 357 639	89.06	
S _{85.4}	平均	2 257 955	83.6	2 139 444	90.1	1 974 321	53.3	317 788	42.2	4 083	99.77	1 950 733	84.68	
	对照	13500000	0	21600000	0	2 991 222	0	5 500 000	0	1 744 714	0	12 404 787	0	

小 结

我们用PEG作融合剂通过鼠系B细胞杂交建立了一株稳定分泌抗544A布氏杆菌的杂交瘤细胞系,分泌的Ig为鼠系IgG型,该单抗与土拉弗氏和结肠耶尔森氏菌及布氏杆菌的猪型(S_{1330})、羊型(B_{115})用ELISA方法检测均未见交叉反应,证明为抗牛型544A菌株特异性的杂交瘤细胞系,可供菌型鉴定使用。

虽经反复冻存和复苏及半年多的传代培养,均能稳定分泌特异性抗体,经注入BALB/C小鼠腹腔,收集之腹水效价高达 $1:10^5$ 以上。

使用该单抗(BG_{12})于体外抑菌试验中发现 10^{-6} 稀释约相当于盐酸四环素1单位/毫升,作治疗实验(小鼠模型)分别用544A和 S_{854} 强毒攻击, 10^{-5} 稀释分别为94.5%和89.06%,盐水对照为0。说明 BG_{12} 有可能作为一种布氏杆菌(牛型)治疗剂。

以上研究还在深入试验,目前已进行大动物治疗试验,初步认为应用 BG_{12} MCAb和偶联四环素者实质脏器未出菌,对照则为阳性。效果尚需进一步观察。

牛种布鲁氏菌亚单位苗的试验研究

—544A布鲁氏菌细胞壁脂多糖—多糖—蛋白质复合物的 提纯及免疫原性

赖学琴 张学民 金根源 雷化云 陆东林

指导：史丕裕 孔昭敏

用2.5%NaCl溶液从牛种布鲁氏菌(544A)强毒菌株提取一种细胞壁脂多糖—多糖—蛋白复合物,称为牛种布鲁氏菌亚单位疫苗(Bracella—abortus—Subunitvaccine),将其分为经 γ 射线照射及不经照射的两组进行试验。分别给体重250—300克健康豚鼠皮下免疫,30天后用同源强毒1000个菌作皮下攻击。试验结果表明对两组动物都具有一定的保护作用。与对照组感染率96%比较,含蛋白140 μ g BASV所接种的豚鼠脏器未经照射和照射获得保护率分别为68.0%和56.0%,经卡方测验, X^2 值分别为22.2和16.09, $P < 0.01$,差异非常显著。表明此种制剂具有良好的免疫源性。

国内外已研制了牛种布鲁氏菌苗的死苗、弱毒苗和化学苗。著名的S19号弱毒苗及45/20佐剂苗以及我国培育的M₅和S₂弱毒苗,对控制布病的发生与流行起到过很好的作用。但仍然存在着某些尚待解决的问题。弱毒苗给孕畜注射后可引起流产,减量则影响免疫效力。活苗还有返祖的现象,故不理想,急需进一步改进。

为了解决目前使用全菌细胞菌苗存在的问题,使被接种者不接触活菌体而达到免疫的目的,近年来,我们开展了对牛种布鲁氏菌BASV的提取和免疫源性等研究,以提纯一种无毒高效并可能作为一种公众所接受的牛种布鲁氏菌亚单位苗使用。现将初步研究结果报告如下。

材料及方法

(1) 菌种: CMcc(B) 55212-A544

(2) 细胞壁脂多糖—多糖—蛋白复合物的提取

粗提: 冻干菌启封培养经动物复壮,接种培养基培养24—48小时,经纯净检验后注入2.5%NaCl溶液,并置4℃冰箱72小时,每日振荡数次。此时取样镜检和接种斜面与三培养基证明无杂菌生长,混合液在4℃15000rpm/分离速离心30分钟,收集上清液,置入4℃等渗的NaCl溶液透析,经浓缩、冻干即为粗提液。

纯化: 上述浓缩液样品加入20倍的5%TCA,定时摇动,经3小时,离心得上清液,加入15倍的5%TCA,收集提取液透析24—72小时,直到酸性反应消失为止,透析液pH为7.0。然后改用蒸馏水透析24小时,再经6000rpm/分离离心后冷冻干燥保存。

上述粗制品进行透析至pH7.0时,按1体积蛋白样品溶液加入浓度为0.21毫克/毫升TCA0.5体积,并使最终浓度为7%(w/v),置0℃冰箱3小时。以上操作必须在0℃进行,生成沉淀经3 000rpm/分离心。按体积加入15倍量的5%TCA或Methyl Alcohol蒸馏水(1:1),然后分别用Alcohol和Ether洗涤,悬液以3 000rpm/分离心40分钟,即可获得沉淀物。此抗原简称BASV(Braccia—Abortus—Subnit—Vaccine)。

(3) 化学成分测定

蛋白含量的测定:按Lowry等分析法。

核酸含量的测定:按常规生化法。

脂多糖含量和类脂成分测定:用气相色谱法。

多糖含量的测定:采用苯酚硫酸法(M·Daboie et al. Andchen)。

(4) 动物试验

豚鼠:体重250—300克健康豚鼠(由八一农学院健康动物室提供)分三组,每组5只。

制剂:分BASV—1及BASV—2(照射 γ 射线1 000R),各注射5只,每只注射制剂蛋白含量40毫微克,免疫后30天以相应毒攻击。

(5) 攻击

强毒株544A制成悬液后,以每只腹腔接种1 000个菌,攻击后30天剖杀检菌并设对照组。

试验结果

(1) 攻毒后血清学抗体水平测定见表1。

表1 血清学抗体水平

组 别	只 数	SPT (阳)	REPT (阳)	S A T										平 均 值
				1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560		
原苗组	5	5/5	5/5	—	—	—	—	—	1	2	2	—	830	
BASV—1	5	5/5	5/5	—	—	—	—	—	2	1	2	—	896	
照射组	5	5/5	5/5	—	—	—	—	—	2	1	2	—	896	
BASV—2	5	5/5	5/5	—	—	—	—	1	2	1	1	—	844	
对照组	5	5/5	5/5	—	—	—	—	1	2	1	1	—	844	

(2) 剖杀检菌

检菌部位:肝、脾、肺、肾、淋巴,各接种胰蛋白胨平皿2个,置37℃温箱,3—5天后取出判定。

菌落计数:1—10个(+),11—50个(++),51—100个(+++),数不清(#),未生长(—)。

脏器保护率:凡脏器不出菌者为保护。